

Partial Translation of Japanese Laid-Open Patent Publication No. 59-82096

Date of Laid-Open: May 11, 1984

Application No. 57-190982

Filing date: October 29, 1982

Applicant: Toyoboseki Kabushiki Kaisha

Inventors: Toshio Sato et al.

Title of the Invention:

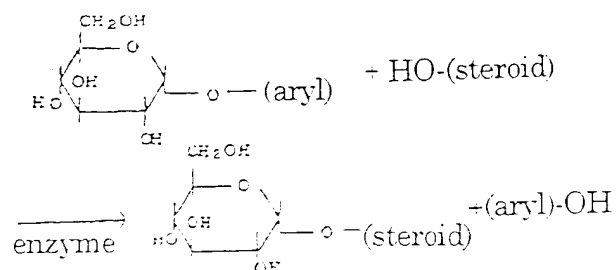
A method for producing a steroid glycoside

Claim:

1. A method for producing a steroid glycoside comprising reacting an α -aryl glycoside and/or a β -aryl glycoside with a steroid compound having an alcoholic hydroxyl group in the presence of α -glycosidase and/or β -glycosidase in an aqueous solution, in an aqueous solution containing an organic solvent, or in a dispersed vehicle comprising an aqueous phase and an organic phase.

Page 2, upper left column, line 17 to lower right column, line 3

The reaction of the present invention can be explained by the following formula:



In the above formula, the glucose and the like are merely an embodiment of the present invention.

An α - (or β -) aryl glycoside, one of the starting materials, is a conjugate in which a sugar chain and an aryl group are bound by an α (or β)-glycoside linkage. The aryl group includes a phenyl group, a naphthyl group, an anthryl group, a phenanthryl group and the like. The aryl group may have a substituent such as an alkyl group (for example, a lower alkyl group such as a methyl group, an ethyl group, a propyl group, an isopropyl group, a butyl group), a nitro group, a halogen, an alkoxy group (for example, a lower alkoxy group such as a methoxy group, an ethoxy group, a propoxy group, an isopropoxy group, a butoxy group), an acyl group (for example, a lower alkanoyl group such as an acetyl group, a propionyl group, a butyryl group), and an acyloxy group (for example, a lower alkanoyloxy group such as an acetyloxy group, a propionyloxy group, a butyryloxy group).

The saccharide includes a monosaccharide, a disaccharide, a trisaccharide, and an oligosaccharide. With respect to the number of carbon atoms, the saccharide is not limited to a hexose or a pentose. Typically, the saccharide can include glucose, galactose, rhamnose, fucose, maltose, lactose, and gentiobiose.

The above described aryl glycoside used as a starting material of the present invention is a saccharide substituted with the above described aryl group. The combination of the saccharide and the aryl group is not limited. Typically, the aryl glycoside can include phenyl- α (or β)-D-galactoside, phenyl- α (or β)-D-glucoside, and toluyl- α (or β)-D-galactoside.

Page 2, lower right column, line 18 to page 3, upper left column, line 2

An α (or β)-glycosidase used in the present invention may be derived from any source. Depending on the saccharide to be used, glucosidase, galactosidase or the like is utilized as a glycosidase. In view of the reaction in industrial scale, a glycosidase derived from a microorganism is desired.

Page 3, lower right column, line 17 to page 4, upper left column, line 2

Example 1

Synthesis of Gitoxigenin- β -galactoside (3 β -O- β -galactosyl-14,16 β -dihydroxy-5 β -Card-20(22)-enolide) from phenyl- β -D-galactoside and Gitoxigenin

Page 4, upper right column, lines 6 to 11

Example 2

Synthesis of Digitoxigenin- β -glucoside (3 β -O-Glucosyl-14-hydroxy-5 β -card-20(22)-enolide) from phenyl- β -D-glucoside and Digitoxigenin

Page 4, lower left column, lines 13 to 19

Example 3

Synthesis of 16 β ,17 β -epoxy-17 α -Digitoxigenin- β -galactoside (3 β -O- β -galactosyl-14-hydroxy-16 β ,17 β -epoxy-5 β ,17 β -card-20(22)-enolide) from phenyl- β -D-galactoside and 16 β ,17 β -epoxy-17 α -Digitoxigenin

Page 4, lower right column, lines 8 to 12

Example 4

Synthesis of Androsterone- β -D-glucoside (3 α -O- β -Glucosyl-5 α -androstan-17-one) from phenyl- β -D-glucoside and Androsterone

⑪ 公開特許公報 (A)

昭59—82096

⑫ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号
 C 12 P 33/00 7235—4B
 A 61 K 31/70 7169—4C
 C 07 J 1/00 7043—4C
 19/00 7043—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)5月11日

発明の数 1
 審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ ステロイド配糖体の製造法

⑮ 特 願 昭57—190982

⑯ 出 願 昭57(1982)10月29日

特許法第30条第1項適用 昭和57年7月10日
 社団法人日本薬学会発行「第4回天然薬物の
 開発と応用シンポジウム講演要旨集」に発表

⑰ 発 明 者 佐藤利夫

徳島市丈六町長尾57番3号

⑱ 発 明 者 三尾直樹

徳島市沖浜町浜道677番地の1

⑲ 発 明 者 大井康弘

徳島市南昭和町3丁目53—1

⑳ 発 明 者 橋本敏弘

徳島市中昭和町1丁目112番地

㉑ 出 願 人 東洋紡績株式会社

大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

㉒ 代 理 人 弁理士 植木久一

明 細 書

1. 発明の名称

ステロイド配糖体の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 水溶液中、有機溶媒を含有する水溶液中、または水相と有機溶媒相とからなる分散媒中で、 α -グリコシダーゼ及び/又は β -グリコシダーゼの存在下、 α -アリアルグリコシド及び/又は β -アリアルグリコシドと、アルコール性水酸基を有するステロイド化合物との反応を行なわせることを特徴とするステロイド配糖体の製造法。

3. 発明の要約的な説明

発明の詳細な説明

本発明は、酸基反応によるステロイド配糖体の製造法に関するものである。

ジギタリス、ケジギタリス、チヨウセンアサガオ等の薬用植物類に含まれているステロイド配糖体は、種々の循環器疾患、殊にうつ血性心不全症の特効薬として重用されており、寿命の延長に伴ってその重要性は益々増大していくものと期待されている。しかしこれら配糖体は一般に高毒性で

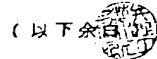
あり、薬用量と中毒量が極めて接近しているという欠点に加え、蓄積性に富むという問題があり、患者への投与に当つては細心の注意を払わなければならない。この様なところから、前記配糖体における部分構造を変え、有効性を維持しつつ毒性のみを軽減しようという試みがなされており、これらの研究の中から、配糖体における糖部分、特にステロイド骨核(アグリコン)に直接結合する糖部分が薬理効果及び毒性に対して特に重要な関係を有するということが明らかにされた。その為前記配糖体における糖部分の入れ換えが検討され、アグリコンたるステロイドに色々な糖類を結合させる研究が展開されている。しかし従来の方法はステロイド骨核に対して糖を直接反応させる純化学的方法であり、反応条件の下で置換基類の脱離や分解、或はその他の化学的变化を招くという危険が大きく、色々なステロイド配糖体を自由に製造できるという望みには至っていない。

本発明者等はこのような状況を考慮し、ステロイド骨核のアルコール性水酸基に対して色々な糖類

を自由に置換させることのできる方法を提供すべく種々研究を重ねた結果、 α -（又は β -）アリアルグリコシドを糖の供与体とし、グリコシダーゼを触媒として遊離ステロイド（1級、2級又は8級のアルコール性水酸基を有するステロイド）を反応させたところ、極めて緩和な条件で反応が進行し、前記ステロイドをアグリコンとする様々な配糖体が得られることを知り、更に検討を重ね本発明を完成するに至つた。

即ち本発明は、水溶液中、有機溶媒を含有する水溶液中、または水相と有機溶媒相とからなる分散媒中で、 α -グリコシダーゼ及び／又は β -グリコシダーゼの存在下に、 α -アリアルグリコシド及び／又は β -アリアルグリコシドと、アルコール性水酸基を有するステロイド化合物との反応を行なわせる点に要旨が存在する。

本発明の反応を化学式によつて例示的に説明すると、



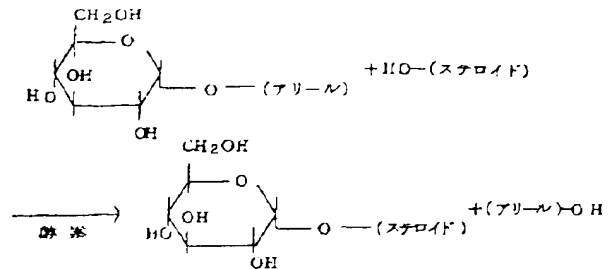
(3)

イソプロポキシ基、ブトキシ基等の低級アルコキシ基）、アシル基（例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチル基等の低級アルカノイル基）、アシルオキシ基（例えばアセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基、ブチルオキシ基等の低級アルカノイルオキシ基）等を置換基として有することができる。

一方糖類としては、単糖類、二糖類、三糖類或はその他のオリゴ糖が利用され、又炭素数についても、六炭糖、五炭糖等の別を問うものではないが、代表的なものを例示しておく、グルコース、ガラクトース、ラムノース、フコース、マルトース、ラクトース、ゲンチオビオース等を挙げることができる。

そして本発明の原料物質として用いられる前記アリアルグリコシドとは、上記の如く例示した糖に対して同じく上記の如く例示したアリアル基を置換させたものであり、その組合わせは任意であるが、特に代表的なものを例示すると、フェニル- α （又は β ）-D-ガラクトシド、フェニル-

(5)



と表わすことができる。但し上記化学式におけるグルコース等は本発明の一例を示すものに過ぎない。

オザ一方の原料物質たる α -（又は β -）アリアルグリコシドとは、アリアル基と糖が α （又は β ）-グリコシド結合したものであり、該アリアル基としては、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基等が例示され、これらはアルキル基（例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基等の低級アルキル基）、ニトロ基、ハロゲン、アルコキシ基（例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、

(4)

α （又は β ）-D-グルコシド、トリル- α （又は β ）-D-ガラクトシド等を示すことができる。

他方の反応試剤である、遊離の水酸基を有するステロイド化合物としては、ステロイド骨格の8位に β -水酸基又は時に α -水酸基を有する天然ステリンや合成ステリンをはじめとして、任意の位置に1級、2級或は8級の遊離水酸基を有するステロイド化合物が利用される。該ステロイド化合物の選択範囲は極めて広く、天然又は合成の如何を問うものではないことは前述の通りであるが、生理的乃至薬理的作面から分類される各種ステロイド、例えば前述のステリンの他、ビタミンD、胆汁酸、男性ホルモン、女性ホルモン、副腎皮質ホルモン、植物心甾醇、ガマセ、ステロイドサポニン、ステロイドアルカロイド、トリメチルステロイド等の全てが本発明の対象になる。

反応に用いられる α （又は β ）-グリコシダーゼとしては、如何なる基原のものでも良く、糖の種類に応じてグリコシダーゼ、ガラクトシダーゼ

(6)

等を利用するが、工業的規模における反応を行なうことを考慮すれば微生物基原のものが望ましい。又反応を有機溶媒の存在下に行なう場合(後述)には、酵素の活性が若干抑制されるので、水溶液中での酵素活性に対して5%以上の相対活性を残留するもの、例えばアスペルギルス・オリゼー(*Aspergillus oryzae*)由来のグリコシダーゼ、或はクルイベロマイセス・ラクチス(*Kluyveromyces Lactis*)由来のグリコシダーゼ等が望ましい。尚酵素の相対活性が低いときには、酵素使用量を増やして補う様にすることが望まれる。

上記反応試剤からなる反応は溶液中で行なわれるが α (又は β)-グリコシダーゼ、並びに α (又は β)-アリアルグリコシドは、いずれも一般に水溶性が高いので、他方の反応試剤たるステロイド化合物が水溶性であるとき、例えばコハク酸ブレドニゾロン、デキサメタゾン硫酸エステル、デキサメタゾンリン酸エステル、ベタメサゾンリン酸エステルなどを用いるときは水溶液中で反応を行なえば良い。尚ここに言う水溶液とは、単に

(7)

塩、酢酸やプロピオン酸等の酸類等を例示することができる。即ちステロイドの溶解性を高めはするが、グリコシダーゼを失活させず適度の活性を前記程度に維持するものであれば、単独及び併用の如何を問わず自由に利用できる。尚有機溶媒の混合量は、親水性及び上記諸効果を考慮して定めれば良く、(水-有機溶媒)混合溶媒全量に対して5~80重量%、好ましくは10~60重量%の範囲で配合する。

ステロイド化合物が尚十分に溶解されないときは、 α (または β)-アリアルグリコシド及び酵素を前記水溶液として準備すると共に、ステロイド化合物を有機溶媒に溶解し、これらを2相系で反応させることが推奨される。ここで用いられる溶媒として前記例示の有機溶媒であつて配合比を大きくすることによつて2相となるものの他、ヘキサンやペンタン等の脂肪炭化水素類；シクロヘキサンやシクロペンタン等の環状炭化水素類；シクロヘキサノンやシクロペンタノン等の環状ケトン類；クロルベンゼンやニトロベンゼン等の芳香

(8)

水溶液である場合の他、酸又は塩基によつてpHを調整したもの、緩衝能のある物質を加えてpHを調整したもの、或は適当な塩類を含むものを包含する。尚pHの上記調整に当つては、通常pH 8~9の中から選択するが、前述のアスペルギルス・オリゼー由来のグリコシダーゼを用いる時はpH 5、又クルイベロマイセス・ラクチス由来のグリコシダーゼを用いる場合は、pH 7という如く、酵素に応じた最適のpHを選択しなければならない。

上記水溶性ステロイド化合物以外の一般ステロイド化合物は、程度の差こそあれ水に対して難溶性であるから、この場合は上記水溶液に適當な有機溶媒(好ましくは親水性有機溶媒)を加えることが望ましい。該有機溶媒としては、酢酸エチル等のアルキルエステル類；アセトンやメチルエチルケトン等のアルキルケトン類；アセトニトリル；ジオキサン；ジメチルホルムアミド；ジメチルスルホキシド；ジクロロメタンやクロロホルム等のハロメタン類；ピリジンやピリミジン等の塩

(9)

族溶媒が例示される。これらについてもステロイド化合物を溶解し、且つ酵素類の活性を前記程度に維持し得るという限度において自由に使用できるが、水相と有機溶媒相の混合比(V/V)は、(1:10)~(10:1)であることが望ましい。

反応温度やその他の条件については本発明を制限するものではないが、一般的な条件を述べると、反応温度としては4~50℃程度、反応時間としては5~800分(時によれば24時間近く)程度で反応を遂行させることが望ましい。

本発明で知られるステロイド配糖体は、公知物質及び新規物質を含むが、天々の生理的乃至薬理的作用に基づき、医薬品として使用することができる。

次に本発明を実施例によつて説明する。

実施例1

フェニル- β -D-ガラクトシドとジトキシゲニン(Glutoxigenin)よりジトキシゲニン- β -ガラクトシド(β -O- β -galactosyl-14,

16β-dihydroxy-5β-Card-20(22)-enolide)の合成

フェニル-β-D-ガラクトシド1.28g(5mmol)とジトキシゲニン0.50g(1.28mmol)とを25mlのアセトニトリルと15mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH5)に懸濁し、さらに、アスペルギルスオリゼーのβ-ガラクトシダーゼ860mgを12mlのリン酸緩衝液(pH5)に溶かした液10mlを加え、20℃で20分間インキュベート後沸とう浴中に5分間置き、次で filtrate する。沈殿を洗浄し、母液と洗液を合してエバポレーターで溶媒を除去したのち水80mlを加え、この液よりクロロホルム200ml数回にてジトキシゲニンを抽出する。水層を濃縮し、セファデックスG-25を水飽和n-ブタノールで平衡化させたカラムにかけ、水飽和n-ブタノールで洗脱する。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去する。残渣は、シリカゲルの中圧カラムにかけ、クロロホルム100ml次で、メタノール-クロロホルム混液で順次溶出する。反

01

この母液と、残渣の洗液とを合してエバポレーターで溶媒を除去する。残渣に水80mlを加え、この中に含まれるジトキシゲニンをベンゼンで抽出除去する。水層は、水飽和n-ブタノールで平衡化したセファデックスG-25カラムにかけ、同じ溶媒で溶出する。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去する。残渣をシリカゲル中圧カラムにかけ、最初クロロホルム次いでメタノール-クロロホルム混液で順次溶出する。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去し、さらに薄層クロマトグラフィーにて精製する。mp 284-286℃, 収量18.4mg(1.9%)

実施例8

フェニル-β-D-ガラクトシドと16β, 17β-エポキシ-17α-ジトキシゲニンより16β, 17β-エポキシ-17α-ジトキシゲニン-β-ガラクトシド(8β-O-β-galactosyl)-14-hydroxy-16β, 17β-epoxy-5β, 17α-Card-20(22)enolideの合成

フェニル-β-D-ガラクトシド1.28gと

03

反応生成物の分画を集め、溶媒を留去する。残渣は、シリカゲル薄層に洗脱する。残渣は、クロロホルム-メタノール混液である。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去し、目的物を得る。mp 218-220℃ 収量18.7mg, (2.6%)

実施例2

フェニル-β-D-グルコシドとジトキシゲニン(Digitoxigenin)よりジトキシゲニン-β-D-グルコシド(8β-O-Glucosyl)-14-hydroxy-5β-card-20(22)-enolide)の合成

フェニル-β-D-グルコシド1.28g(5mmol)とジトキシゲニン500mg(1.84mmol)とを25mlのアセトニトリルと15mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH5)の混液に溶解する。一方、アスペルギルスオリゼーのβ-ガラクトシダーゼ1.08gを12mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH5)に溶解し、この10mlを先の混液に加え、10℃にて18時間放置する。反応液を沸とう浴中5分間加熱して反応を止め、filtrate し、

02

16β, 17β-エポキシ-17α-ジトキシゲニン500mgとを実施例1の条件で反応させる。このあと同様にゲニンの除去、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーを行なつて精製する。mp 197-199℃, 収量16.1mg(2.8%)

実施例4

フェニル-β-D-グルコシドとアンドロステロン(Androstereone)よりアンドロステロン-β-D-グルコシド(3α-O-β-Glucosyl)-5α-androstan-17-one)の合成

フェニル-β-D-グルコシド0.218g(0.85mmol)を6mlの0.1Mリン酸緩衝液(pH7)に溶解する。一方クルイペロマイセスワクサスのβ-ガラクトシダーゼ0.170gを0.1Mリン酸緩衝液(pH7)2.4mlに溶解し、先の水溶液に加える。更にアンドロステロン0.247g(0.85mmol)をニトロベンゼン1.7mlに溶解したものを加え60℃で20

06

分間断しく攪拌する。反応液を0℃に冷却した水80mlと四塩化炭素10mlの混液にかけ、よく振り混ぜてから遠沈する。水層をとり、メタノール80mlを加え、20℃で1時間放置後再び遠沈する。その上清をとりエバポレーターで溶媒を留去し、残渣を得る。一方、クロロホルム25ml、エタノール25mlと水10mlをよく振り混ぜたのち静置し、二相が分離したら、上層と下層をそれぞれ分取する。この上層に先に得た残渣を加え、これに下層の4分の1を加えて振り混ぜたのち、静置して下層を分取する。この操作を4回行ない、下層を合わせて、エバポレーターで溶媒を留去する。残渣を少量のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムにかけ、クロロホルム-メタノール-水=16:8:1 (V/V) 混液の下層で溶出する。目的物の分画を集め、溶媒を留去する。mp 228℃、収量0.6mg (0.2%)。

実施例5

合成配糖体に Na^+ , K^+ -ATPase 活性阻害効果

04

表1

化 合 物	I ₅₀ (μM)
ジトキシゲニン	0.7
ジトキシゲニン-β-グルコシド	0.8
ジトキシゲニン-β-ガラクトシド	1
ジギトキシゲニン	0.2
ジギトキシゲニン-β-グルコシド	0.2
ジギトキシゲニン-β-ガラクトシド	0.2
16β, 17β-エポキシジギトキシゲニン	> 20
16β, 17β-エポキシジギトキシゲニンガラクトシド	40

出願人 東洋紡績株式会社

代理人 弁護士 橋本久一

ジギタリス配糖体の標的は、各部の細胞膜に存在する Na^+ , K^+ -ATPase であつて、特に心筋細胞のATPaseを阻害することによつて、強心効果をあらわすと言われている。この為、強心配糖体のスクリーニングの手段として、 Na^+ , K^+ -ATPase の阻害作用を調べることは、一般に受け入れられている。本発明者らは、本発明において合成した各種配糖体の Na^+ , K^+ -ATPase 阻害作用を検討し、これら物質が強心作用を有する可能性を検討した。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は、アーメド及びトーマスの方法 (K. Ahmed and B.S. Thomas J. Biol. Chem. 246, 109-109 (1971)) を多少改良して測定した。阻害活性は、阻害濃度を横軸として得られる阻害曲線より50%阻害濃度 (I₅₀) を求め、これに表示した。結果を表1に示す。これから明らかなように、合成した配糖体は、そのゲニンとほぼ同程度のI₅₀を示し、強心作用を保持している可能性が強く示唆された。

(本行余)

09

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—82096

⑪ Int. Cl.³
C 12 P 33/00
// A 61 K 31/70
C 07 J 1/00
19/00

識別記号

庁内整理番号
7235—4B
7169—4C
7043—4C
7043—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)5月11日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ ステロイド配糖体の製造法

⑮ 特 願 昭57—190982

⑯ 出 願 昭57(1982)10月29日

特許法第30条第1項適用 昭和57年7月10日
社団法人日本薬学会発行「第4回天然薬物の
開発と応用シンポジウム講演要旨集」に発表

⑰ 発 明 者 佐藤利夫

徳島市丈六町長尾57番3号

⑱ 発 明 者 三尾直樹

徳島市沖浜町浜道677番地の1

⑲ 発 明 者 大井康弘

徳島市南昭和町3丁目53—1

⑳ 発 明 者 橋本敏弘

徳島市中昭和町1丁目112番地

㉑ 出 願 人 東洋紡績株式会社

大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

㉒ 代 理 人 弁理士 植木久一

明 細 書

1. 発明の名称

ステロイド配糖体の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 水溶液中、有機酸を含有する水溶液中、または水相と有機酸相とからなる分散媒体中で、 α -グリコシダーゼ及び/又は β -グリコシダーゼの存在下に、 α -アリアルグリコシド及び/又は β -アリアルグリコシドと、アルコール性水酸基を有するステロイド化合物との反応を行なわせることを特徴とするステロイド配糖体の製造法。

8. 発明の発明を説明

発明の詳細な説明

本発明は、置換反応によるステロイド配糖体の製造法に関するものである。

ジギタリス、ケジギタリス、チロウセンアサガオ等の薬用植物類に含まれているステロイド配糖体は、種々の循環器疾患、殊にうつ血性心不全症の特効薬として重用されており、寿命の延長に伴ってその重要性は益々増大していくものと期待されている。しかしこれら配糖体は一般に高毒性で

あり、薬用量と中毒量が極めて接近しているという欠点に加え、蓄積性に富むという問題があり、患者への投与に当つては細心の注意を払わなければならない。この様なところから、前記配糖体における部分構造を変え、有効性を維持しつつ毒性のみを軽減しようという試みがなされており、これらの研究の中から、配糖体における糖部分、特にステロイド骨核(アグリコン)に直接結合する糖部分が薬効効果及び毒性に対して特に重要な関係を有するということが明らかにされた。その為前記配糖体における糖部分の入れ換えが検討され、アグリコンたるステロイドに色々な糖類を結合させる研究が展開されている。しかし従来の方法はステロイド骨核に対して糖を直接反応させる純化学的方法であり、反応条件の下で置換基類の脱離や分解、或はその他の化学的変化を招くという危険が大きく、色々なステロイド配糖体を自由に製造できるという域には至っていない。

本発明者等はこのような状況を鑑み、ステロイド骨核のアルコール性水酸基に対して色々な糖類

を自由に置換させることのできる方法を提供すべく種々研究を重ねた結果、 α -（又は β -）アリアルグリコシドを糖の供与体とし、グリコシダーゼを触媒として遊離ステロイド（1級、2級或は8級のアルコール性水酸基を有するステロイド）を反応させたところ、極めて緩和な条件で反応が進行し、前記ステロイドをアグリコンとする様々な配糖体が得られることを知り、更に検討を重ね本発明を完成するに至つた。

即ち本発明は、水溶液中、有機溶媒を含有する水溶液中、または水相と有機溶媒相とからなる分散媒体中で、 α -グリコシダーゼ及び／又は β -グリコシダーゼの存在下に、 α -アリアルグリコシド及び／又は β -アリアルグリコシドと、アルコール性水酸基を有するステロイド化合物との反応を行なわせる点に要旨が存在する。

本発明の反応を化学式によつて例示的に説明すると、



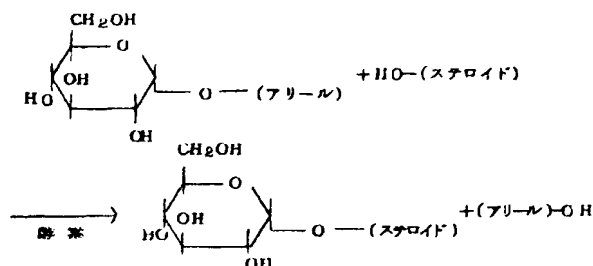
(3)

イソプロポキシ基、ブトキシ基等の低級アルコキシ基）、アシル基（例えばアセチル基、プロピオニル基、ブチル基等の低級アルカノイル基）、アシルオキシ基（例えばアセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基、ブチルオキシ基等の低級アルカノイルオキシ基）等を置換基として有することができる。

一方糖類としては、単糖類、二糖類、三糖類或はその他のオリゴ糖が利用され、又炭素数についても、六炭糖、五炭糖等の別を問うものではないが、代表的なものを例示しておくと、グルコース、ガラクトース、ラムノース、フコース、マルトース、ラクトース、ゲンチオビオース等を挙げることができる。

そして本発明の原料物質として用いられる前記アリアルグリコシドとは、上記の如く例示した糖に対して同じく上記の如く例示したアリアル基を置換させたものであり、その組合わせは任意であるが、特に代表的なものを例示すると、フェニル- α （又は β ）-D-ガラクトシド、フェニル-

(5)



と表わすことができる。但し上記化学式におけるグルコース等は本発明の一例を示すものに過ぎない。

まず一方の原料物質たる α -（又は β -）アリアルグリコシドとは、アリアル基と糖類が α （又は β ）-グリコシド結合したものであり、該アリアル基としては、フェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基等が例示され、これらはアルキル基（例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基等の低級アルキル基）、ニトロ基、ハロゲン、アルコキシ基（例えばメトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、

(4)

α （又は β ）-D-グルコシド、トルイル- α （又は β ）-D-ガラクトシド等を示すことができる。

他方の反応試剤である、遊離の水酸基を有するステロイド化合物としては、ステロイド骨格の8位に β -水酸基又は時に α -水酸基を有する天然ステリンや合成ステリンをはじめとして、任意の位置に1級、2級或は8級の遊離水酸基を有するステロイド化合物が利用される。該ステロイド化合物の選択範囲は極めて広く、天然又は合成の如何を問うものではないことは前述の通りであるが、生体的乃至薬理的作用面から分類される各種ステロイド、例えば前述のステリンの他、ビタミンD、胆汁酸、男性ホルモン、女性ホルモン、副腎皮質ホルモン、植物心臓糖、ガマセ、ステロイドサポニン、ステロイドアルカロイド、トリメチルステロイド等の全てが本発明の対象になる。

反応に用いられる α （又は β ）-グリコシダーゼとしては、如何なる基原のもでも良く、糖の種類に応じてグルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ

(6)

等を利用するが、工業的規模における反応を行なうことを考慮すれば微生物基原のものが望ましい。又反応を有機溶媒の存在下に行なう場合（後述）には、酵素の活性が若干抑制されるので、水溶液中での酵素活性に対して5倍以上の相対活性を残留するもの、例えばアスペルギルス・オリゼー（*Aspergillus oryzae*）由来のグリコシダーゼ、或はクルイベロマイセス・ラクチス（*Kluyveromyces Lactis*）由来のグリコシダーゼ等が望ましい。尚酵素の相対活性が低いときには、酵素使用量を増やして補う様にすることが望まれる。

上記反応試剤からなる反応は溶液中で行なわれるが α （又は β ）-グリコシダーゼ、並びに α （又は β ）-フリールグリコシドは、いずれも一般に水溶性が高いので、他方の反応試剤たるステロイド化合物が水溶性であるとき、例えばコハク酸プレドニゾロン、デキサメタゾン硫酸エステル、デキサメタゾンリン酸エステル、ベタメタゾンリン酸エステルなどを用いるときは水溶液中で反応を行なえば良い。尚ここに言う水溶液とは、厳に

(7)

基；酢酸やプロピオン酸等の酸類等を例示することができる。即ちステロイドの溶解性を高めるが、グリコシダーゼを失活させず適度の活性を前記程度に維持するものであれば、単独及び併用の如何を問わず自由に利用できる。尚有機溶媒の混合量は、親水性及び上記諸効果を考慮して定めれば良く、（水-有機溶媒）混合溶媒全量に対して5～80重量％、好ましくは10～60重量％の範囲で配合する。

ステロイド化合物が尚十分に溶解されないときは、 α （または β ）-フリールグリコシド及び酵素を前記水溶液として準備すると共に、ステロイド化合物を有機溶媒に溶解し、これらを2相系で反応させることが推奨される。ここで用いられる溶媒として前記例示の有機溶媒であつて配合比を大きくすることによつて2相となるものの他、ヘキササンやペンタン等の鎖状炭化水素類；シクロヘキササンやシクロペンタン等の環状炭化水素類；シクロヘキサノンやシクロペンタノン等の環状ケトン類；クロルベンゼンやニトロベンゼン等の芳香

(8)

水溶液である場合の他、酸又は塩基によつてpHを調整したもの、触媒能のある物質を加えてpHを調整したもの、或は適当な塩類を含むもの等を包含する。尚pHの上記調整に当つては、通常pH 8～9の中から選択するが、前述のアスペルギルス・オリゼー由来のグリコシダーゼを用いる際はpH 5、又クルイベロマイセス・ラクチス由来のグリコシダーゼを用いる場合は、pH 7という様に、酵素に応じた最適のpHを選択しなければならない。

上記水溶性ステロイド化合物以外の一般ステロイド化合物は、程度の差こそあれ水に対して難溶性であるから、この場合は上記水溶液に適当な有機溶媒（好ましくは親水性有機溶媒）を加えることが望ましい。該有機溶媒としては、酢酸エチル等のアルキルエステル類；アセトンやメチルエチルケトン等のアルキルケトン類；アセトニトリル；ジオキサン；ジメチルホルムアミド；ジメチルスルホキシド；ジクロロメタンやクロロホルム等のハロメタン類；ピリジンやピリミジン等の塩

(18)

族溶媒が例示される。これらについてもステロイド化合物を溶解し、且つ酵素類の活性を前記程度に維持し得るという点度において自由に使用できるが、水相と有機溶媒相の混合比（V/V）は、（1：10）～（10：1）であることが望ましい。

反応温度やその他の条件については本発明を制限するものではないが、一般的な条件を述べると、反応温度としては4～50℃程度、反応時間としては5～800分（時によれば24時間近く）程度で反応を進行させることが望ましい。

本発明で得られるステロイド配糖体は、公知物質及び新規物質を含むが、夫々の生理的乃至薬理的作用に基づき、医薬品として使用することができる。

次に本発明を実施例によつて説明する。

実施例1

フェニル- β -D-ガラクトシドとジトキシゲニン（*Gltioxigenin*）よりジトキシゲニン- β -ガラクトシド（ 8β -O- β -galactosyl-14,

16 β -dihydroxy-5 β -Card-20(22)-enolide)の合成

フェニル- β -D-ガラクトシド 1.28 g (5 mmol) とジトキシゲニン 0.50 g (1.28 mmol) とを 25 ml のアセトニトリルと 15 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5) に懸濁し、さらに、アスベルギルスオリゼーの β -ガラクトシダーゼ 860 mg を 12 ml のリン酸緩衝液 (pH 5) に溶かした液 10 ml を加え、20℃で20分間インキュベート後沸とう浴中に5分間置き、次で濾過する。沈殿を洗浄し、母液と洗液を合してエバポレーターで溶媒を除去したのち水 80 ml を加え、この液よりクロロホルム 200 ml 数回にてジトキシゲニンを抽出する。水層を濃縮し、セファデックス G-25 を水飽和 n-ブタノールで平衡化させたカラムにかけ、水飽和 n-ブタノールで展開する。反応生成物の分画を集め溶媒を留去する。残渣は、シリカゲルの中圧カラムにかけ、クロロホルム 100 ml 次で、メタノール-クロロホルム混液で順次溶出する。反

(1)

この母液と、残渣の洗液とを合してエバポレーターで溶媒を除去する。残渣に水 80 ml を加え、この中に含まれるジトキシゲニンをベンゼンで抽出除去する。水層は、水飽和 n-ブタノールで平衡化したセファデックス G-25 カラムにかけ、同じ溶媒で溶出する。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去する。残渣をシリカゲル中圧カラムにかけ、最初クロロホルム次いでメタノール-クロロホルム混液で順次溶出する。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去し、さらに蒸留クロマトグラフィーにて精製する。mp 284-288℃、収量 18.4 mg (1.9%)

実施例 8

フェニル- β -D-ガラクトシドと 16 β , 17 β -エポキシ-17 α -ジトキシゲニンより 16 β , 17 β -エポキシ-17 α -ジトキシゲニン- β -ガラクトシド (8 β -O- β -galactosyl-14-hydroxy-16 β , 17 β -epoxy-5 β , 17 α -Card-20(22)enolide) の合成

フェニル- β -D-ガラクトシド 1.28 g と

反応生成物の分画を集め、溶媒を留去する。残渣は、シリカゲル薄層に展開する。溶媒は、クロロホルム-メタノール混液である。反応生成物の分画を集め、溶媒を留去し、目的物を得る。mp 218-220℃ 収量 18.7 mg, (2.6%)

実施例 2

フェニル- β -D-グルコシドとジトキシゲニン (Digitoxigenin) よりジトキシゲニン- β -D-グルコシド (8 β -O-Glucosyl-14-hydroxy-5 β -card-20(22)-enolide) の合成

フェニル- β -D-グルコシド 1.28 g (5 mmol) とジトキシゲニン 500 mg (1.84 mmol) とを 25 ml のアセトニトリルと 15 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5) の混液に溶解する。一方、アスベルギルスオリゼーの β -ガラクトシダーゼ 1.08 g を 12 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5) に溶解し、この 10 ml を先の混液に加え、10℃にて18時間放置する。反応液を沸とう水浴中5分間加熱して反応を止め、濾過し、

(2)

16 β , 17 β -エポキシ-17 α -ジトキシゲニン 500 mg とを実施例 1 の条件で反応させる。このあとと同様にゲニンの除去、セファデックス G-25 カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーを行なつて精製する。mp 197-199℃、収量 16.1 mg (2.8%)

実施例 4

フェニル- β -D-グルコシドとアンドロステロン (Androsterone) よりアンドロステロン- β -D-グルコシド (8 α -O- β -Glucosyl-5 α -androst-17-one) の合成

フェニル- β -D-グルコシド 0.218 g (0.85 mmol) を 5 ml の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解する。一方クルイペロマイセスラクサスの β -ガラクトシダーゼ 0.170 g を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7) 2.4 ml に溶解し、先の水溶液に加える。更にアンドロステロン 0.247 g (0.85 mmol) をニトロベンゼン 1.7 ml に溶解したものを加え 50℃で 80

(3)

(4)

分間激しく撹拌する。反応液を0℃に冷却した水80mlと四塩化炭素10mlの混液にかけ、よく撹り混ぜてから遠沈する。水層をとり、メタノール80mlを加え、20℃で1時間放置後再び遠沈する。その上清をとりエバゴレーターで溶媒を留去し、残渣を得る。一方、クロロホルム25ml、エタノール25mlと水10mlをよく撹り混ぜたのち静置し、二相が分離したら、上層と下層をそれぞれ分取する。この上層に先に得た残渣を溶かし、これに下層の4分の1を加えて撹り混ぜたのち、静置して下層を分取する。この操作を4回行ない、下層を合わせて、エバゴレーターで溶媒を留去する。残渣を少量のクロロホルムに溶かし、シリカゲルカラムにかけ、クロロホルム-メタノール-水=16:8:1(V/V)混液の下層で溶出する。目的物の分離を認め、溶媒を留去する。mp 22.8℃, 収量0.6mg (0.2%)。

実施例5

合成配糖体に Na^+, K^+ -ATPase 活性阻害効果

04

表1

化 合 物	I ₅₀ (μM)
ジトキシゲニン	0.7
シドキシゲニン-β-グルコシド	0.8
ジトキシゲニン-β-ガラクトシド	1
ジギトキシゲニン	0.2
ジギトキシゲニン-β-グルコシド	0.2
ジギトキシゲニン-β-ガラクトシド	0.2
16β, 17β-エポキシジギトキシゲニン	> 20
16β, 17β-エポキシジギトキシゲニンガラクトシド	40

出願人 東洋紡績株式会社

代理人 井増士 橋本久一



ジギトリス配糖体の標的は、各種の細胞膜に存在する Na^+, K^+ -ATPase であつて、特に心筋細胞のATPaseを阻害することによつて、強心効果をあらわすと言われている。この為、強心配糖体のスクリーニングの手段として、 Na^+, K^+ -ATPase の阻害作用を調べることは、一般に受け入れられている。本発明者らは、本発明において合成した各種配糖体の Na^+, K^+ -ATPase 阻害作用を検討し、これら物質が強心作用を有する可能性を検討した。 Na^+, K^+ -ATPase 活性は、アーメド及びトーマスの方法(K. Ahmed and B. S. Thomas J. Biol. Chem. 246, 108-109 (1971))を多少改良して測定した。阻害活性は、阻害剤濃度を種々変えて得られる阻害曲線より50%阻害濃度(I₅₀)を求め、これを表示した。結果を表1に示す。これから明らかなように、合成した配糖体は、そのゲニンとほぼ同程度のI₅₀を示し、強心作用を保持している可能性が強く示唆された。

(本行余)



04

(54) PREPARATION OF HUMAN γ -INTERFERON

(11) 59-82095 (A) (43) 11.5.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 57-193146 (22) 29.10.1982
 (71) SUNTORY K.K. (72) NAOKI AZUMA(1)
 (51) Int. Cl. C12P21 00, C07G7 00, C12P21 00, C12R1 91

PURPOSE: To produce γ -interferon from human leukocyte or human leukocyte-relating cell, economically, in high yield and purity, by using a serumfree medium and using plural interferon-inducing substances in combination.

CONSTITUTION: Human γ -interferon is prepared from human leukocyte or human T-cell, by using a medium containing restricted amount of human serum albumin as the only protein component, and using Staphylococcus enterotoxin B in combination with OK432 (picibanil) to culture and induce human γ -interferon having high titer, which is separated and purified by affinity column chromatography or chromatofocussing method.

(54) PREPARATION OF STEROID GLYCOSIDE

(11) 59-82096 (A) (43) 11.5.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 57-190982 (22) 29.10.1982
 (71) TOYO BOSEKI K.K. (72) TOSHIO SATOU(3)
 (51) Int. Cl. C12P33/00, A61K31/70, C07J1/00, C07J19/00

PURPOSE: To prepare a steroid glycoside under extremely mild reaction condition, by reacting α - or β -aryl glycoside with free steroid in the presence of glycosidase.

CONSTITUTION: An α - or β -aryl glycoside such as phenyl- α - or - β -D-glucoside, toluyl- α - or - β -D-galactoside, etc. is made to react with a steroid compound having primary, secondary or tertiary alcoholic hydroxyl group at the 3- or other position of the steroid skeleton, in the presence of α -glycosidase or β -glycosidase usually at 4~50°C for about 5~300min.

(54) IMPROVED METHOD FOR PREPARATION OF 6-AMINOPENICILLANIC ACID USING IMMOBILIZED ENZYME PROCESS

(11) 59-82097 (A) (43) 11.5.1984 (19) JP
 (21) Appl. No. 57-189194 (22) 29.10.1982
 (71) TOYO JOZO K.K. (72) FUMIHIRO ISHIMURA(1)
 (51) Int. Cl. C12P37 06

PURPOSE: To prepare 6-aminopenicillanic acid without lowering the enzymatic activity, by treating crude aqueous solution of benzyl-penicillin with an ultrafiltration membrane having a cut-off molecular weight of $\geq 5,000$, and treating the product with immobilized penicillin acylase.

CONSTITUTION: An aqueous extract of benzyl penicillin obtained by the extraction of benzyl penicillin fermentation broth, or a solution obtained by dissolving crude benzyl penicillin or its water-soluble salt separated from the benzyl penicillin fermentation broth in an aqueous medium, is adjusted to the optimum pH of penicillin acylase or thereabout, the aqueous extract of aqueous solution is subjected to the ultrafiltration treatment with a cut-off molecular weight of $\geq 5,000$, and the resultant treated liquid is made to react with an immobilized penicillin acylase.